

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



ITW

Patent
Attorney Docket No. 012679-105

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of

Jong Seob Lee et al.

Application No.: 10/780,703

Filing Date: February 19, 2004

Title: GENE CONTROLLING FLOWERING TIME OF PLANTS AND METHOD FOR MANIPULATING
FLOWERING TIME OF PLANT USING THE SAME

Group Art Unit:

Examiner:

Confirmation No.:

SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

The benefit of the filing date of the following priority foreign application(s) in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed.

Country: Korea

Patent Application No(s): 10-2003-0010772

Filed: February 20, 2003

In support of this claim, enclosed is a certified copy(ies) of said foreign application(s). Said prior foreign application(s) is referred to in the oath or declaration and/or the Application Data Sheet. Acknowledgment of receipt of the certified copy(ies) is requested.

Respectfully submitted,

BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.

By


Susan M. Dadio

Registration No. 40,373

Date: May 25, 2004



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원번호 : 10-2003-0010772
Application Number

출원년월일 : 2003년 02월 20일
Date of Application FEB 20, 2003

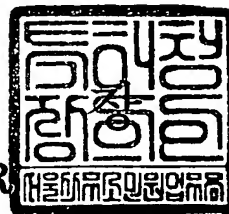
출원인 : 대한민국(서울대학교 총장)
Applicant(s) Seoul National University



2004 년 02 월 16 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.02.20
【발명의 명칭】	식물의 개화시기 조절 유전자 및 이를 이용한 식물의 개화시기 조절 방법
【발명의 영문명칭】	Gene controlling flowering time of plants and method for manipulating flowering time of plant using the same
【출원인】	
【명칭】	대한민국 (서울대학교 총장)
【출원인코드】	2-2000-047513-2
【대리인】	
【성명】	김석현
【대리인코드】	9-1998-000634-1
【포괄위임등록번호】	2002-054274-7
【대리인】	
【성명】	황주명
【대리인코드】	9-1998-000597-5
【포괄위임등록번호】	2002-054275-4
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이종섭
【성명의 영문표기】	LEE, Jong Seob
【주민등록번호】	540108-1056510
【우편번호】	135-270
【주소】	서울 강남구 도곡동 91-5 삼성래미안아파트 107-101호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김윤희
【성명의 영문표기】	KIM, Yun-Hee
【주민등록번호】	781202-2177828
【우편번호】	430-815
【주소】	경기도 안양시 안양7동 137-31호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 최은경
【성명의 영문표기】 CHOI, Eun-Kyung
【주민등록번호】 770103-2026219
【우편번호】 462-152
【주소】 경기도 성남시 중원구 은행2동 783번지
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 유소연
【성명의 영문표기】 YOO, So Yeon
【주민등록번호】 750429-2255415
【우편번호】 465-711
【주소】 경기도 하남시 창우동 신안아파트 416동 103호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 안지훈
【성명의 영문표기】 AHN, Ji Hoon
【주민등록번호】 660119-1565810
【우편번호】 158-077
【주소】 서울 양천구 신정7동 목동신시가지 12단지 1212동 303호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 최양도
【성명의 영문표기】 CHOI, Yang Do
【주민등록번호】 530315-1701811
【우편번호】 137-030
【주소】 서울시 서초구 잠원동 신반포아파트 301-907호
【국적】 KR

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 9
【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인
 김석현 (인) 대리인
 황주명 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 32 면 32,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 0 항 0 원

【합계】 61,000 원

【면제사유】 국가

【면제후 수수료】 0 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 식물의 개화시기 조절 유전자 및 이를 이용한 식물의 개화시기 조절방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)로부터 분리된 식물의 개화시기 조절 유전자 *LOV1* 및 상기 유전자를 식물체에서 과다 발현시켜 식물체의 개화시기를 지연시키거나, *LOV1* 유전자의 발현을 억제하여 식물체의 조기 개화를 유도하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 분리된 *LOV1* 유전자 및 상기 유전자로부터 발현되는 *LOV1* 단백질은 식물의 개화 관련 형질의 개선 및 타 식물체에서 개화 시기 조절 유전자의 탐색 등에 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명에 따라 식물체의 개화시기를 촉진함으로써 꽃과 종자를 단시간 내에 생산하거나 또는 식물체의 개화시기를 지연시켜 영양생장을 지속적으로 유도함으로써 식물체로부터 잎이나 줄기와 같은 유용한 부분의 생산량을 증대시킬 수 있는 효과가 있다.

【대표도】

도 11

【색인어】

개화시기 조절, 유전자

【명세서】

【발명의 명칭】

식물의 개화시기 조절 유전자 및 이를 이용한 식물의 개화시기 조절 방법 {Gene controlling flowering time of plants and method for manipulating flowering time of plant using the same}

【도면의 간단한 설명】

도 1a는 장일 조건 하에서 2개월 동안 재배한 애기장대 야생형과 *lov1-ID* 돌연변이체의 사진이다(A: 애기장대 야생형, B: *lov1-ID* 돌연변이체).

도 1b는 애기장대 야생형과 *lov1-ID* 돌연변이체의 장각 형태를 비교한 사진이다(A: 애기장대 야생형, B: *lov1-ID* 돌연변이체).

도 2는 *lov1-ID* 돌연변이체의 게놈 내로 삽입된 T-DNA 삽입 위치를 나타낸 모식도이다(RB: T-DNA의 오른쪽 경계면, LB: T-DNA의 왼쪽 경계면).

도 3은 본 발명의 개화시기 조절 유전자 *LOVI*에서 보존된 NAC 도메인과 *NAM*, *CUC1* 및 *CUC2* 유전자의 NAC 도메인을 비교하여 도시한 것이다(*: 보존된 염기서열).

도 4는 애기장대 야생형과 *lov1-ID* 돌연변이체에서 *LOVI* 유전자의 발현 정도를 노던 블롯 분석으로 조사한 결과이며, 25S rRNA는 대조군(internal control)이다.

도 5는 *LOVI* 프로모터와 *GUS* 유전자 융합 구조물을 포함하는 재조합 플라스미드 pCAMBIA3200의 작제과정을 나타낸 모식도이다(F: 정방향, R: 역방향, BL: 왼쪽 경계면, BR: 오른쪽 경계면)

도 6은 애기장대 야생형의 각 조직에서 *LOV1* 유전자의 발현 패턴을 노던 블롯으로 분석한 결과이며, 25S rRNA는 대조군(internal control)이다(B: 꽃눈, F: 꽃, Si: 장각, St: 줄기, Cl: 경엽, L: 로켓잎, R: 뿌리).

도 7a는 *LOV1* 프로모터와 *GUS* 유전자 융합 구조물이 도입된 형질전환체의 줄기 정단 분열 조직 및 잎 원기조직에서 *GUS* 활성을 분석한 결과이다(A: 유식물체, B: 영양생장기 식물체의 줄기 정단 부위와 잎 원기조직, C: 15일째 되는 식물체의 줄기 정단 분열 조직의 종단면, D: 꽃 분열 조직의 종단면, E: 꽃 분열 조직의 횡단면, SA: 줄기 정단(shoot apex), LP: 잎 원기(leaf primorida), SAM: 줄기 정단 분열 조직(shoot apical meristem), 스케일 바는 10 μ m이다).

도 7b는 *LOV1* 프로모터와 *GUS* 유전자 융합 구조물이 도입된 형질전환체의 화서 정단 분열 조직, 측생분열조직(axillary meristem) 및 배 발생 시기의 *GUS* 활성을 분석한 결과이다(A: 화서 정단 분열 조직, B: 측면 정단 분열 조직, C: 배 발생, 스케일 바는 50 μ m이다).

도 7c는 *LOV1* 프로모터와 *GUS* 유전자 융합 구조물이 도입된 형질전환체에서 시간의 경과에 따른 *GUS* 활성을 분석한 결과이다(A: 20일, B: 21일, C: 23일, D: 25일, E: 27일, F: 29일, G: 31일, H: 33일, I: 35일, J: 37일, K: 40일).

도 8은 애기장대 야생형과 *lov1-1D* 돌연변이체의 줄기 정단 분열 조직 단면을 해부 현미경으로 관찰한 사진이다(A: 애기장대 야생형, B: *lov1-1D* 돌연변이체, 스케일 바는 20 μ m이다).

도 9는 애기장대 야생형과 *lov1-1D* 돌연변이체의 잎 단면을 해부 현미경으로 관찰한 사진이다(A, B: 야생형, C, D: 야생형과 같은 발달 시기의 *lov1-1D* 돌연변이체, E, F: *lov1-1D*

돌연변이체에서 나중에 나온 잎, A, C, E: 도관계 부위의 종단면 B, D, F: 잎 말단 부위의 종단면, 스케일 바는 20 μ m이다).

도 10은 애기장대 야생형과 *lov1-1D* 돌연변이체에서 *LOV1*, *AGL20* 및 *FLC* 유전자의 발현 정도를 노던 블롯으로 분석한 결과이며, 25S rRNA는 대조군(internal control)이다.

도 11은 본 발명에서 분리된 *LOV1* 유전자와 *AGL20* 및 *FLC*와의 상호 관련성을 나타낸 모식도이다. 화살표는 촉진 작용을 의미하며, T자 형태의 막대는 억제 작용을 의미한다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<15> 본 발명은 식물의 개화시기 조절 유전자 및 이를 이용한 식물의 개화시기 조절 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)로부터 분리된 식물의 개화시기 조절 유전자 *LOV1* 및 상기 유전자를 식물체에서 과발현시켜 식물체의 개화시기를 지연시키거나, *LOV1* 유전자의 발현을 억제하여 식물체의 조기 개화를 유도하는 방법에 관한 것이다.

<16> 식물의 개화는 식물의 성장을 영양생장(vegetative growth)에서 생식생장(reproductive growth) 시기로 전환시키는 상전이(phase transition)를 야기한다. 대부분의 식물은 개화가 적합한 시기에 일어나도록 개화시기를 조절할 수 있는 메커니즘을 가지고 있으며, 이러한 개화시기 조절 메커니즘은 식물체 내부의 유전적 요인과 외부의 환경 요소에 의해 영향을 받는다

(Lang A., *Encyclopedia of Plant Physiology*, Springer-Verlag, 1371-1536, 1965; Napp-Zinn K., *In Manipulation of Flowering*, London, Butterworth, 123-132, 1987; Poethig R. S., 250: 923-930, 1990).

<17> 최근 들어, 식물의 개화시기 조절 메커니즘에 대한 연구가 여러 유전적, 분자생물학적 접근 방법을 통해 쌍자엽 식물인 애기장대를 대상으로 활발히 이루어지고 있다. 그 결과, 애기장대에서 개화시기 조절과 관련된 약 80개의 유전자 자리(genetic loci)가 규명되었고, 네 종류의 개화시기 조절 경로가 밝혀졌다 (Simpson et al., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 519-550, 1999; Araki T., *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 6368, 2001). 첫 번째는 광주기 의존 경로 또는 장일 경로라고 불리는 경로 (photoperiod dependent pathway, or long day pathway)로서 이 경로에 관여하는 유전자로는 피토크롬 (phytochrome)이나 크립토크롬 (cryptochrome)과 같은 광수용체를 암호화하는 유전자들과 *GI*(GIGANTEA), *CO*(CONSTANS), *FT*(Flowering locus T), *FWA*(Flowering Wageningen), *SOC1*(Suppress or of CO overexpression 1; *AGL20*) 등이 알려져 있다 (Yaron Y. et al., *The Plant Cell*, 10:1973-1989, 1998). 두 번째는 온도에 의한 개화조절 경로(vernalization pathway)로서, 식물이 장시간 저온에 노출되었을 때 개화가 촉진되는 경로이며 이 경로와 관련된 유전자로서 *VRN1*(Reduced Vernalization Response 1), *VRN2*(Reduced Vernalization Response 2), *FRI*(Frigida), *FLC*(Flowering locus C) 등의 유전자가 클로닝되었다. 세 번째는 장일조건이나 단일조건에 모두 영향을 미치며 개화를 조절하는 자발적 경로 (autonomous pathway)로서

FCA(Flowering locus CA), *FVE*, *LX*(Luminidependens)와 같은 유전자들이 이 경로에 관여하고 있다(Yaron Y. et al., *The Plant Cell*, 10:1973-1989, 1998). 마지막으로 주로 단일조건에서 영향을 미치는 경로이며 여기에는 식물호르몬의 일종인 GA(gibberellic acid)가 필수적인 역할을 하는 지베렐린 경로가 있다. 이 경로에는 *GAI*이나 *GAI*(GA Insensitive), *RG*(Repressor of *gai-3*) 등의 유전자들이 관여하고 있는 것으로 보고되어 있으며, 주로 GA 호르몬의 생합성에 관여하는 유전자나 GA 호르몬의 신호전달에 관여하는 유전자들이 이 경로에 참여하고 있다(Araki T., *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4: 6368, 2001).

<18> 이와 같이 규명된 식물의 개화시기 조절과 관련된 유전자를 이용하여 식물의 개화시기를 인위적으로 조절하고자 하는 시도가 이루어지고 있다. 식물의 개화시기를 인위적으로 조절하는 것은 학문적으로나 농업 및 원예 분야와 같은 산업적인 측면에서 매우 중요한 의미를 갖는다. 학문적으로 개화조절 메커니즘을 연구하는 것은 초기 배발생(embryogenesis)과 더불어 고등식물에서의 기관 발생을 규명하는데 매우 유용하다. 또한, 산업적인 측면으로는 원예작물의 개화시기를 촉진함으로써 꽃과 종자의 생산을 단시간 내에 생산할 수 있으며, 농작물의 개화시기를 지연시켜 영양생장을 지속적으로 유도함으로써 농작물로부터 유용한 부분의 생산량을 증대시킬 수 있는 효과가 있다.

<19> 미국특허 제6,225,530호에는 애기장대로부터 분리한 식물의 개화시기 조절 유전자 *FT* (flowering locus T), 상기 *FT*에 의해 코딩되는 폴리펩티드 및 *FT* 유전자를 이용하여 식물의 개화시기를 조절하는 방법이 개시되어 있다. 또한, 미국특허 제6,444,877호에는 풍나무(*Liquidambar styraciflua*; Sweetgum)로부터 분리한 개화시기 조절 유전자 *LSAG* 및 이를 이용한 식물의 개화시기 조절 방법이 개시되어 있다. 대한민국특허 제319395호에는 애기장대의 생체 시계 및 개화시기 조절 유전자 자이겐티아(GIGANTEA)가 개시되어 있다.

<20> 그러나, 식물의 개화시기 조절은 상당히 복잡한 과정을 통해 일어나며 아직까지 완전히 규명되지 않은 다양한 유전자가 관여할 것으로 생각되고 있기 때문에, 식물의 개화시기 조절에 관여하는 새로운 유전자 및 그 기능에 대한 연구가 요구되고 있다.

<21> 이에 본 발명자들은 애기장대로부터 새로운 개화시기 조절 메커니즘과 관련이 있는 유전자를 연구하던 중, 활성화 표지 선별법(activation tagging screen)에 의해 과다 발현시 애기장대의 개화를 지연시키는 기능을 가진 *LOV1* 유전자를 분리하였으며 이를 이용하여 식물의 개화시기를 조절할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<22> 따라서, 본 발명의 목적은 식물의 개화시기 조절 단백질 *LOV1*을 제공하는 것이다.

<23> 본 발명의 다른 목적은 상기 *LOV1* 단백질을 암호화하는 식물의 개화시기 조절 유전자를 제공하는 것이다.

<24> 본 발명의 다른 목적은 상기 식물의 개화시기 조절 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

<25> 본 발명의 다른 목적은 상기 벡터로 형질전환된 박테리아를 제공하는 것이다.

<26> 본 발명의 다른 목적은 상기 식물의 개화시기 조절 유전자를 이용하여 식물체의 개화시기를 조절하는 방법을 제공하는 것이다.

<27> 본 발명의 다른 목적은 상기 식물의 개화시기 조절 유전자 및 단백질을 이용하여 식물의 개화시기 조절 유전자 또는 단백질을 선별하는 방법을 제공하는 것이다.

- <28> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 LOV1 단백질 또는 상기 단백질을 발현하는 재조합 세포와 후보물질을 배양한 다음 LOV1 단백질의 활성 또는 발현에 미치는 효과를 측정하는 단계를 포함하는 LOV1 단백질의 활성 또는 발현에 영향을 주는 화합물을 동정하는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <29> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2로 표시되는 식물의 개화시기 조절 단백질 LOV1을 제공한다.
- <30> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 LOV1 단백질을 암호화하는 식물의 개화시기 조절 유전자를 제공한다. 상기 식물의 개화시기 조절 유전자는 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하며, 보다 바람직하게는 서열번호 3으로 표시된다. 또한, 상기 식물의 개화시기 조절 유전자는 개화촉진 유전자로 알려진 *AGL20* 유전자를 억제하는 것을 특징으로 한다.
- <31> 또한, 본 발명은 상기 식물의 개화시기 조절 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 박테리아를 제공한다.
- <32> 또한, 본 발명은 식물의 개화시기 조절 유전자를 이용하여 식물체의 개화시기를 조절하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 식물체에서 *LOV1* 유전자를 과다 발현시킴으로써 개화시기를 지연시키거나 또는 *LOV1* 유전자의 발현을 억제시킴으로써 개화시기를 촉진하는 것을 특징으로 한다.
- <33> 또한, 본 발명은 상기 식물의 개화시기 조절 유전자 및 단백질을 이용하여 식물의 개화시기 조절 유전자 또는 단백질을 선별하는 방법을 제공한다.

- <34> 또한, 본 발명은 상기 LOV1 단백질 또는 상기 단백질을 발현하는 재조합 세포와 후보물질을 배양한 다음 LOV1 단백질의 활성 또는 발현에 미치는 효과를 측정하는 단계를 포함하는 LOV1 단백질의 활성 또는 발현에 영향을 주는 화합물을 동정하는 방법을 제공한다. 상기 화합물은 LOV1 단백질 활성 또는 발현을 촉진하거나 억제하는 것을 특징으로 한다.
- <35> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <36> 본 발명자들은 개화시기 조절에 관여하는 유전자를 탐색하기 위하여, 애기장대에 활성화 표지 선별법(activation tagging screen)을 이용하여 개화가 지연된 형질을 나타내는 돌연변이를 선별하였다. 본 발명에서 사용한 활성화 표지 선별법은 칼리플라워 모자이크 바이러스의 35S 프로모터 인핸서 서열이 비교적 멀리 떨어져 있는 상태에서도 주변 유전자의 전사를 활성화시킬 수 있다는 점을 이용하여 기능 획득 돌연변이체를 얻는 공지된 방법이다(Weigel et al., *Plant Physiology*, 122: 1003-1013., 2000). 보다 구체적으로 말하면, 상기 활성화 표지 선별법은 T-DNA 내에 선별 마커, 복제 기원(replication origin) 및 항생제 또는 제초제 저항성 유전자를 가지고 있으며 그 T-DNA 오른쪽 경계면내에 35S CaMV 인핸서(35S CaMV enhancer) 4개를 가지고 있는 활성화 표지 벡터를 애기장대 게놈에 무작위로 도입시킨 후 주위 유전자의 전사를 활성화시키고, 기능 획득 표현형을 나타내는 식물체를 선별한 다음 식물체의 게놈 DNA를 회수하여 전사 활성화된 유전자를 클로닝하는 방법이다.
- <37> 본 발명의 일 실시예에서는 애기장대를 대상으로 개화가 지연된 변이체를 선별하기 위해, 현재 당 분야에서 상용되고 있는 활성화 표지 벡터인 pSKI015를 이용하여 변이체를 생산한 다음, 성장한 개체들 중에서 육안으로 개화가 지연되는 변이체를 선별하고 선별된 변이체를 '*lov1-ID* 돌연변이체'로 명명하였다. 이후, 상기 *lov1-ID* 돌연변이체의 개화지연 형질을 확인하기 위

해, 야생형 애기장대와 개화시기를 비교하였다. 그 결과, 상기 돌연변이체는 야생형에 비해 꽃대의 형성이 2달 가량 늦게 나타났으며, 2달이 지나도 꽃대가 형성되지 않은 경우도 있었다. 또한, *lov1-ID* 돌연변이체의 경우에 비정상적인 장각 형태가 나타났으며, 야생형에 비해 로켓 잎의 수가 증가함을 볼 수 있었다. 이러한 표현형의 변화는 돌연변이체에서 영양생장 시기가 야생형에 비해 길어졌기 때문에 나타난 현상이라 사료되었다.

<38> 본 발명의 다른 실시예에서는 플라스미드 회수 방법을 이용하여 상기 *lov1-ID* 돌연변이체에서 식물의 개화시기 조절에 관련된 유전자를 분리하고, 그 염기서열을 결정하였다. 분리된 유전자는 전체 게놈 크기가 2606bp였으며, 379개의 아미노산을 암호화하는 ORF(open reading frame)를 가지고 있음을 확인하였다. 본 발명자들은 상기 본 발명의 유전자와 진뱅크 상의 공지된 다른 유전자와의 서열 상동성을 조사한 결과, 본 발명의 유전자는 NAC 도메인 유전자군의 일원인 패튜니아(*Perunia hybrida*)의 *NAM*, *CUC1* 및 *CUC2* 유전자와 상동관계를 보였다. 즉, 본 발명의 유전자와 NAC 도메인 유전자군에서 첫 번째와 두 번째 엑손이 보존되어 있음을 알 수 있었다. 따라서, 본 발명에 따른 유전자는 오직 식물에만 존재하며 줄기 정단 분열 조직의 유지와 떡잎 분리와 같은 식물 발달 과정에서 중요한 역할을 하는 NAC 도메인 유전자군에 속하는 것으로 사료되었다. 이에 본 발명자들은 본 발명의 유전자를 *LOVI*(Long Vegetative phase 1)으로 명명하였다. 또한, 본 발명자들은 상기 결정된 유전자의 염기서열로부터 Mac DNASIS 프로그램을 이용하여 아미노산 서열을 유추하였다. 상기 아미노산 서열은 서열번호 2에 표시한 바와 같다.

<39> 본 발명의 또 다른 실시예에서는,

lov1-ID 돌연변이체에서 나타나는 개화지연 표현형이 *LOV1* 유전자의 활성화에 의한 것인지를 확인하기 위해 *LOV1* 유전자를 탐침으로 하여 노던 블롯 분석을 수행하였다. 그 결과, 야생형에 비해 *lov1-ID* 돌연변이체에서 *LOV1* 유전자가 과다 발현되고 있음이 관찰되었다.

<40> 또한, 본 발명자들은 *LOV1* 유전자의 공간적 및 시간적 발현 양상을 조사하기 위해, 애기장대 야생형에서 다양한 조직들로부터 RNA를 추출하고 *LOV1* 유전자에 특이적인 탐침으로 노던 블롯을 수행한 결과 *LOV1* 유전자는 주로 줄기에서 발현하며 모든 조직에서 기본적으로 발현하고 있음이 관찰되었다. 나아가, 본 발명자들은 *LOV1* 유전자의 프로모터 부분과 *GUS* (*beta*-glucuronidase) 유전자가 융합된 핵산 구조물을 작제하고 이를 포함하는 발현벡터로 애기장대를 형질 전환한 다음 *GUS* 유전자 활성을 분석함으로써 *LOV1* 유전자의 발현 패턴을 조사하였다. 그 결과, *LOV1* 유전자는 영양생장 시기의 식물의 정단 분열 조직에서 강하게 발현됨을 확인할 수 있었다. 더불어, *LOV1* 유전자의 발현은 개화가 일어난 후 및 배 발달 동안에 지속적으로 나타남을 확인할 수 있었다.

<41> 또한, 본 발명의 다른 실시예에서는 야생형 애기장대와 *lov1-ID* 돌연변이체의 줄기 정단 분열 조직의 해부학적 구조 차이를 조사하였다. 그 결과, *lov1-ID* 돌연변이체에서 줄기 정단 분열 조직과 잎의 단면이 야생형에 비해 세포의 크기와 수가 증가되었음을 알 수 있었다. 따라서, *lov1-ID* 돌연변이체는 영양생장 시기가 길어지면서 개화가 지연되었음을 재확인할 수 있었다.

<42> 또한, 본 발명자들은 본 발명의 *LOV1* 유전자와 공지된 다른 개화시기 유전자와의 유전적 상호 관련성을 조사하고자, *lov1-ID* 돌연변이체에서 개화촉진 유전자인 *AGL20* 유전자와 개화억제 유전자인 *FLC* 유전자의 발현 수준을 노던 블롯 분석으로 조사하였다. 그 결과, 야생형에 비해 *lov1-ID* 돌연변이체에서 *AGL20* 유전자의 발현 수준이 감소하고 *FLC* 유전자의 발현은 변화가 없

음이 관찰되었다. 이로부터, *LOV1*의 과다발현이 *AGL20*의 발현을 감소시켜 개화를 지연시킨다는 사실을 알 수 있었다.

<43> 따라서, 본 발명은 식물의 개화시기 조절 단백질 *LOV1*을 제공한다. 본 발명에 따른 식물의 개화시기 조절 단백질의 범위는 애기장대로부터 분리된 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상의, 바람직하게는 80%, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 식물체 내에서 과다발현시 식물의 개화를 지연시키는 활성을 의미한다. 보다 바람직하게는 개화촉진 유전자인 *AGL20*의 발현을 억제하여 식물의 개화를 지연시키는 활성을 의미한다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 식물의 개화시기 조절 단백질 *LOV1*은 서열번호 2로 표시된 아미노산 서열을 갖는다. 본 발명에 따른 단백질 *LOV1*은 자연(예컨대, 식물 세포)으로부터 추출하거나 또는 *LOV1* 단백질을 암호화하는 재조합 핵산의 발현에 의해 또는 화학적 합성에 의해 수득될 수 있다.

<44> 또한, 본 발명은 상기 *LOV1* 단백질을 암호화하는 식물의 개화시기 조절 유전자를 제공한다. 본 발명의 식물의 개화시기 조절 유전자는 *LOV1* 단백질을 암호화하는 게놈 DNA와 cDNA를 모두 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다. 더욱 바람직하게는 본 발명에 따른 식물의 개화시기 조절 유전자는 서열번호 3으로 표

시되는 *LOV1*이다. 또한, 본 발명에 따른 식물의 개화시기 조절 유전자는 보존된 NAC 도메인을 가지고 있으며 개화촉진 유전자인 *AGL20* 유전자를 억제하는 것을 특징으로 한다.

<45> 상기 본 발명에 따른 개화시기 조절 유전자는 적합한 발현 벡터 내로 삽입되어 식물세포를 형질전환 할 수 있다. "발현 벡터"라는 용어는 *LOV1* 유전자 서열이 삽입 또는 도입될 수 있는 당분야에 공지된 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체를 의미한다. 본 발명의 개화시기 조절 유전자 서열은 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동 가능하게 연결된 유전자 서열과 발현 조절 서열은 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함될 수 있다. "작동 가능하게 연결(operably linked)"된다는 것은 적절한 분자가 발현 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 발현 조절 서열 일 수 있다. "발현 조절 서열(expression control sequence)"이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 식물

<46> 세포 내로 *LOV1* 유전자를 도입시키기 위한 적합한 벡터로는 Ti 플라스미드, 뿌리 유도성(Ri) 플라스미드 및 식물 바이러스 벡터가 있다. 상기 적합한 벡터의 예로는 이에 한정되지는 않으나, pPZP, pGA 및 pCAMBIA 계열과 같은 바이너리벡터를 사용하는 것이 바람직하다. 당업자라면 본 발명의 *LOV1* 유전자의 핵산 서열을 도입시키는 데 적합한 벡터를 선택할 수 있으며, 본 발명에서는 *LOV1* 유전자 서열을 식물 세포 내로 도입할 수 있는 벡터라면 어떠한 벡터라도 모두 사용할 수 있다.

<47> 본 발명에 따른 재조합 벡터는 당분야에 공지된 방법을 사용하여 식물 세포내에 도입할 수 있다. 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 아그로박테리움 (*Agrobacterium sp.*) 속 미생물을 이용한 형질전환, 입자 총 충격(particle gun bombardment), 실리콘 탄화물 위스커(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리 (sonication), 일렉트로포레이션(electroporation)법 및 PEG(Polyethyleneglycol) 방법을 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 재조합 벡터로 형질 전환된 숙주세포를 제공한다. 상기 숙주세포로는 박테리아가 바람직하며, 그 예로는 대장균 또는 아그로박테리움 속 미생물이 있다.

<48> 또한, 본 발명은 식물의 개화시기 조절 유전자를 이용하여 식물체의 개화시기를 조절하는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 식물체에서 *LOV1* 유전자를 과다 발현시킴으로써 식물체의 개화시기를 지연시키거나 또는 식물체에서 *LOV1* 유전자의 발현을 억제시킴으로써 식물체의 개화시기를 촉진시키는 것을 특징으로 하는 식물체의 개화시기를 조절하는 방법을 제공한다.

<49> 식물체에서 *LOV1* 유전자를 과다발현시키는 방법으로는 *LOV1* 유전자를 포함하고 있는 식물체 또는 *LOV1* 유전자를 포함하고 있지 않은 식물체 내로 *LOV1* 유전자를 도입함으로써 수행될 수 있다. 상기에서 "유전자의 과다발현"이란 야생형 식물에서 발현되는 수준 이상으로 *LOV1* 유전자가 발현되도록 하는 것을 의미한다. 식물체내로 *LOV1* 유전자를 도입하는 방법으로는 프로모터의 조절을 받는 *LOV1* 유전자가 포함된 발현 벡터를 이용하여 식물체를 형질전환 하는 방법이 있다. 상기에서 프로모터로는 식물체 내에 삽입 유전자를 과다발현시킬 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않는다. 상기 프로모터의 예로는 이에 한정되지는 않으나, CaMV의 35S RNA 및

19S RNA 프로모터; 피크워드 모자이크 비루스(FMV)에서 유래한 전질이 전사 프로모터 및 TMV의 코트 단백질 프로모터를 들 수 있다. 또한, 단자엽 식물이나 목본식물체에서 *LOV1* 유전자를 과다발현하기 위해서는 유비퀴틴(ubiquitin) 프로모터를 사용할 수 있다.

<50> 식물체에서 *LOV1* 유전자의 발현을 억제하는 방법으로는 당업계에 공지된 여러 가지 방법을 이용할 수 있다. 상기 "유전자의 발현 억제"에는 유전자 전사의 억제 및 단백질로의 번역 억제가 포함된다. 또한, 유전자 발현이 완전히 정지된 것 뿐 만 아니라 발현이 감소된 것도 포함된다.

<51> 식물에서 특정의 내재성 유전자의 발현을 억제하는 방법으로는 안티센스 분자를 이용하는 것이 가장 보편적이다. 안티센스 분자가 표적 유전자의 발현을 억제하는 작용으로는 삼중쇄 형성에 의한 전사개시 저해, RNA 폴리머라제에 의해 국부적인 개상 루프 구조가 만들어진 부위에서 하이브리드 형성에 의한 전사 억제, 합성이 진행되고 있는 RNA에서 하이브리드 형성에 의한 전사 저해, 인트론과 엑손과의 접합점에서 하이브리드 형성에 의한 스플라이싱 억제, 스플라이소좀 형성 부위에서 하이브리드 형성에 의한 스플라이싱 억제, mRNA와의 하이브리드 형성에 의한 핵으로부터 세포질로의 이행 억제, 번역 개시인자 결합 부위에서 하이브리드 형성에 의한 번역개시 억제 등이 있다. 이들은 전사, 스플라이싱 또는 번역 과정을 저해하여 표적 유전자의 발현을 억제한다.

<52> 본 발명에 사용되는 안티센스 분자는 상기의 어느 작용으로든지 표적 유전자의 발현을 억제해도 좋다. 대표적인 안티센스 분자로는 3중쇄, 리보자임 (ribozyme), RNAi, 또는 안티센스 핵산 등이 포함된다. 3중쇄는 이중 나선 DNA 주변을 감아 3 본쇄 나선을 형성하도록 함으로써 전사 개시가 억제되도록 한다.(Maher et al.,

Antisense Res. and Dev., 1(3):227, 1991; Helene, C., *Anticancer Drug Design*, 6(6):569, 1991). 리보자임은 1 본쇄 RNA를 특이적으로 절단하는 능력을 보유한 RNA 분자이다. 리보자임은 RNA 분자 내 특정 뉴클레오티드 서열을 인식하여 부위특이적으로 절단하도록 조작될 수 있다(Cech, *J. Amer. Med. Assn.*, 260:3030, 1998). 따라서, 이 방법의 주요 장점은 이들이 서열 특이적이기 때문에 특정 서열을 갖는 mRNA만이 불활성화된다는 것이다. RNAi는 염기서열 특이적으로 작용하는 헤어핀형태의 소분자의 RNA를 사용하여 전사 수준 혹은 전사 후 수준에서 유전자 발현을 억제시키는 방법이다(Mette et al., *EMBO J.*, 19: 5194-5201, 2000). 안티센스 핵산은 특정 mRNA 분자와 적어도 일부분이 상보적인 DNA 또는 RNA 분자를 말한다(Weintraub, , 262:40, 1990). 세포 내에서, 안티센스 핵산은 이에 상응하는 mRNA와 하이브리드화하여 2 본쇄 분자를 형성한다. 이로 인해 mRNA의 해독이 저해된다(Marcus-Sakura, *Anal. Biochem.*, 172:289, 1988).

<53> 본 발명에 따른 식물체의 개화시기 조절 방법은 *LOV1* 유전자의 발현을 억제함으로써 원예작물의 개화시기를 촉진하여 꽃과 종자의 생산을 단시간 내에 생산하거나 또는 *LOV1* 유전자를 과다 발현시킴으로써 농작물의 개화시기를 지연시켜 영양생장을 지속적으로 유도함으로써 농작물로부터 유용한 부분의 생산량을 증가시키는데 적용될 수 있다.

<54> 본 발명의 방법에 의해 개화가 조절될 수 있는 식물체로는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 팥, 귀리, 수수를 포함하는 식량작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근을 포함하는 채소작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩, 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거



베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐, 페레니얼라이그라스 등을 포함하는 사료작물류가 포함된다.

<55> 한편, 본 발명의 *LOV1* 유전자 및 *LOV1* 단백질은 공지된 유전공학적인 방법을 사용하여 식물의 개화와 관련된 형질 개선 및 타 식물체의 개화 조절 유전자의 탐색 등에 유용하게 이용될 수 있다. 예를 들면, DNA 칩, 단백질 칩, 중합효소 연쇄반응, 노던 블롯 분석, 서던 블롯 분석, 효소 면역 반응 및 2-D 겔 분석 등을 포함한 다양한 방법을 사용할 수 있다.

<56> 또한, 본 발명은 본 발명의 *LOV1* 단백질의 활성 또는 *LOV1* 유전자의 발현에 영향을 주는 물질을 동정하는 방법을 제공한다. 구체적으로 *LOV1* 단백질 또는 상기 단백질을 발현하는 재조합 세포와 후보물질을 배양한 다음 *LOV1* 단백질의 활성 또는 유전자 발현에 미치는 효과를 측정하는 단계를 포함하는 *LOV1* 단백질의 활성 또는 유전자 발현에 영향을 주는 화합물을 동정하는 방법을 제공한다. 상기에서 *LOV1* 단백질의 활성 또는 유전자 발현에 영향을 준다는 것은 상기 단백질의 활성 또는 발현을 촉진시키거나 억제하는 활성을 말한다. 후보물질이 *LOV1* 단백질 또는 유전자 발현에 미치는 영향은 당분야에 공지된 노던 블롯 분석 및 웨스턴 블롯 분석 등을 통해 측정할 수 있다. *LOV1* 단백질 활성 또는 유전자 발현에 영향을 주는 화합물로는, 예를 들면, 펩티드, 폴리펩티드, 펩티드 모조물, 화합물 및 생물제제 등이 포함될 수 있다.

<57> 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다.

<58> 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

<59> <실시예 1>

<60> 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)로부터 개화지연 돌연변이체의 선별

<61> 애기장대에서 돌연변이를 유도하기 위하여, 활성 표지(activation tagging) 벡터인

pSKI015(The Salk Institute, CA, USA의 Dr. Detlef Weigel로부터 분양받음)를 마이크로펄서(micro pulser, Bio-Rad)를 이용한 공지의 전기천공법(electroporation)으로 아그로박테리움 튜메파시엔스 GV3101(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101)에 도입시킨 후, 카나마이신(kanamycine)과 카베니실린(carbenicillin)이 포함된 배지에서 pSKI015 벡터가 도입된 아그로박테리움 균주를 선별하였다. 선별된 아그로박테리움 균주로 플로랄 딥 방법(floral dip method) (Clough et al., *Plant J.*, 16(6):735-743, 1998)에 따라 야생형 애기장대 (*Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0)를 형질전환하였다. 즉, pSKI015 벡터를 운반하는 아그로박테리움 균주를 겐타마이신(gentamycin)과 앰피실린(ampicillin)이 포함된 YEP 배지에 접종하여 흡광도가 0.8이 될 때까지 28℃에서 배양하였다. 그 배양액을 원심 분리한 후 침전된 세포를 5% 설탕 용액에 현탁하였다. 상기 용액에 Silwet L-77을 0.05%(500 μ l/L)의 농도가 되도록 첨가하고, 애기장대의 토양 상부만을 상기 용액에 5초 내지 7초 동안 침수시킨 후 건져내었다. 상기 식물체는 높은 습도를 유지시켜 주기 위해 뚜껑을 덮어두고 16시간에서 24시간 동안 방치해 놓았다. 상기와 같은 방법으로 형질전환된 애기장대를 계속 배양하여 다음세대의 종자를 수확하였다. 애기장대의 야생형과 *lov1-1D* 돌연변이체 종자를 4℃에서 약 2-3일간 춘화처리하여 종자들의 발아시기를 일정하도록 하였다. 춘화처리한 종자들을 포트에 일정한 간격



으로 파종하고 장일조건 (16시간 낮/8시간 밤), 23℃에서 재배하였다. 떡잎이 나오고 2장의 로젯잎이 나오면 제초제 바스타(basta, ammonium glufosinate)를 2주간 주 2회씩 살포하여 pSKI015 벡터가 도입된 형질전환체를 선별하였다. 선별된 형질전환체를 23℃의 온실에서 재배하여 개화가 지연되는 변이체를 선별하였다. 상기 변이체를 *lovI-ID* 돌연변이체로 명명하였다.

<62> <실시예 2>

<63> 개화지연 돌연변이체의 개화시기 및 표현형의 변화 조사

<64> 상기 실시예 1에서 선별된 *lovI-ID* 돌연변이체의 개화시기와 표현형의 변화를 애기장대 야생형과 비교하여 조사하였다. 꽃대가 형성되고 난 후 그 길이가 약 5cm정도 되었을 때 개화기의 지표로 삼고 이 시기에 형성되어 있는 1차 로젯잎과 경엽의 수를 세어 개화시기의 지표로 삼았다.

<65> 실험 결과,

lov1-ID 돌연변이체는 약 2달 후에 꽃대가 나왔으며, 야생형 애기장대의 경우에는 약 2~3주 후에 꽃대가 나왔다. 야생형 애기장대의 경우 돌연변이체에서 꽃대가 나온 시기에는 잎이 노랗게 변하고 말랐으며, 종자를 수확할 만큼 노화과정에 들어갔음을 관찰할 수 있었다. 일부 돌연변이체는 2달이 지나도 꽃대가 나오지 않은 것도 있었다. 한편, 야생형 애기장대의 경우에 보통 12-13장의 로켓잎을 가지는데 반해 돌연변이체에서는 꽃대가 나올 무렵 로켓잎의 수가 약 30-35장이었다(도 1a). 이는 *lov1-ID* 돌연변이체가 야생형에 비해 영양생장기가 길어지면서 개화가 지연되었음을 보여주는 것이다. 한편, 상기 *lov1-ID* 돌연변이체는 야생형에 비해 비정상적인 장각(silique) 형태를 나타내었다. 상기 돌연변이체의 장각 모양은 암술(carpel) 개수의 증가로 인해 짧고 뭉뚝한 곤봉 형태로 나타났다(도 1b). 상기 돌연변이체에서의 이러한 장각 형태의 변화는 *FLC* 유전자가 과발현된 애기장대에서 관찰된 표현형과 유사했다(Hepworth S. R. et al., *EMBO J.* 21(16):4327-4337, 2002). 이러한 표현형의 유사성으로부터 본 발명의 돌연변이체에서 과다발현된 유전자가 다른 종류의 개화시기 조절 유전자와 상호 관련성이 있을 것으로 추정되었다.

<66> <실시예 3>

<67> *LOV1* 유전자의 클로닝 및 서열 분석

<68> *lov1-ID* 돌연변이체로부터 인핸서에 의해 활성화된 T-DNA 주변의 유전자를 탐색하기 위해, 플라스미드 회수 방법에 따라 유전자를 분리하였다. 먼저, *lov1-ID* 돌연변이체로부터 디엔이지 플랜트 미니 키트(DNeasy plant mini kit, QIAGEN??)를 이용하여 전체 게놈을 분리하였다.

이후, 2 μ g의 게놈 DNA를 다음과 같은 여러 제한 효소(New England Biolabs, NEB)로 절단하였다. T-DNA의 오른쪽 경계면 근처의 염기서열을 회수하는 데 사용되는 제한효소로는 *KpnI*, *EcoRI* 및 *HindIII*가 알려져 있으며, T-DNA의 왼쪽 경계면 근처의 염기서열을 회수하는 데 사용되는 제한효소로는 *BamHI*, *SpeI* 및 *NotI*이 알려져 있다. 따라서, 상기 각각의 제한효소를 게놈 DNA에 모두 처리한 결과, *HindIII*를 이용한 플라스미드 회수시도에서 성공적으로 게놈 DNA를 회수하였다. 상기 절단된 DNA를 페놀-클로로포름을 처리한 후 T4-DNA 리가제(ligase)를 첨가하여 4°C에서 자가 결합(self-ligation) 시켰다. 결합된 DNA를 침전시킨 후 TE 완충액에 용해시킨 다음 이를 이용하여 전기천공법 (electroporation)으로 *E. coli* DH5 α 세포(Bio-Rad)를 형질전환시켰다. 상기 *E. coli*에 LB 배지(트립톤 1%, 효모추출물 0.5%, NaCl 0.5%, pH 7.0) 1mL를 가하고 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 배양이 완료되면, 상기 배양액을 앰피실린(ampicillin)을 포함하는 LB 고체 배지(상기 LB 배지에 박토-아가 1.5% (w/v)를 첨가하여 제조됨)에 도말하고 37°C에서 하룻밤 동안 배양하여 항생제에 저항성을 지니는 콜로니를 선별하였다. 상기 선별된 콜로니를 LB 배지에서 배양한 다음 알칼리 용해법(alkaline lysis)을 이용하여 DNA를 분리하고(Birnboim H. C. et al., *Nucleic Acids Res.*, 7:1513-1523, 1979), T-DNA 삽입 지역의 오른쪽 경계면에 위치한 식물의 DNA 염기서열을 퍼킨-엘머사(Perkin-Elmer, USA)의 DNA 자동 서열 결정기 및 DNA 서열 결정 키트(Big dye terminator sequencing kit)를 이용하여 결정하였다. 결정된 DNA의 염기서열을 서열분석 프로그램(Mac DNASIS program, Hitachi Software Engineering, America Ltd., San Bruno, CA)으로 분석하고 상기 염기서열로부터 아미노산 서열을 유추하였다. 또한, 분석된 본 발명 유전자의 염기서열과 진뱅크(Genbank) 상의 공지된 다른 유전자의 염기서열과의 서열 상동성을 조사하였다.

<69> 실험 결과, 분리된 유전자는 CaMV 35S 인핸서(enhancer)를 포함하는 T-DNA의 오른쪽 경계면으로부터 대략 8kb 떨어진 부위에 위치해 있었다. 또한, T-DNA의 왼쪽 경계면 일부가 애기장대의 유전자와 연결되어 있는 오른쪽 경계면 끝에 몇 베이스 정도 전도되어 삽입되어 있었다(도 2). 분리된 유전자의 전체 게놈 크기는 2606bp였으며, 379개의 아미노산을 암호화하는 1140bp 크기의 ORF(open reading frame)을 가지고 있었다. 또한, 본 발명의 유전자는 NAC 도메인 유전자군의 일원인 패튜니아(*Perunia hybrida*)의 *NAM*, *CUC1* 및 *CUC2* 유전자와 상동관계가 있음을 알 수 있었다(도 3). 즉, 상기 NAC 도메인 유전자군 간에는 첫 번째와 두 번째 엑손 부분에 NAC도메인이 보존되어 있었다(Duval et al., *Plant Molecular Biology*, 50: 237-248, 2002). 이에 본 발명자들은 본 발명의 유전자를 *LOV1*(*Long Vegetative phase 1*)으로 명명하였다. 본 발명에 따른 *LOV1* 유전자의 전체 게놈 서열 및 cDNA는 서열번호 3 및 서열번호 1에 나타내었으며, *LOV1* 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 2에 나타내었다.

<70> <실시예 4>

<71> 애기장대 야생형 및 *lov1-ID* 돌연변이체에서 *LOV1* 유전자의 발현 조사

<72> 상기 실시예 3에서 분리한 *LOV1* 유전자가 CaMV 35S 인핸서에 의해 실제로 *lov1-ID* 돌연변이체 내에서 애기장대 야생형에 비해 과다발현 되는지를 확인하기 위해, 상기 *LOV1* 유전자에 특이적인 탐침으로 노던 블롯 분석을 수행하였다. 먼저, 18일간 동일한 조건으로 배양한 애기장대 야생형과 *lov1-ID* 돌연변이체로부터 각각의 RNA를 알엔이지 플랜트 키트(RNeasy plant kit, QIAGEN?)로 분리하였다. 각각의 총 RNA 10 µg을 1×MOPS 완충액(200mM MOPS, pH 7.0, 50mM

NaOAc, 10mM EDTA)이 흡수된 1% 포르말데히드 아가로스 겔(formaldehyde agarose gel)에 로딩하여 분리한 다음 EtBr(ethidium bromide)을 처리한 후 20×SSC를 이용하여 나일론막(Hybond N⁺ membrane)으로 옮겼다. 상기 나일론 막을 가볍게 2×SSC로 세척하고 건조시켰다. 나일론막에 옮겨진 RNA를 1mM EDTA, 0.5M 인산나트륨(sodium phosphate), 1×덴하르트 용액(Denhardt's solution), 1% BSA 및 7% SDS로 처리하였다. 이를 *LOVI* 유전자에 특이적인 표지된 탐침과 65℃에서 하룻밤 동안 혼성화하였다. 혼성화가 완료되면, 나일론 막을 65℃에서 2×SSC와 0.1% SDS로 5분간 세척하고 0.2×SSC와 0.1% SDS로 동일한 온도에서 5분간 세척하고 건조 한 후 X선 필름에 노출시켜 방사선으로 감광된 밴드를 검출하였다. 상기에서 혼성화에 사용한 탐침은 프라임-a-유전자 시스템(Prime-a-gene system, Promega)과 [α -³²P]dATP를 이용한 무작위 프라이머 표지방법(random primer labelling)에 의해 제조하였다.

<73> 실험 결과, 야생형 애기장대에 비해 *lov1-ID* 돌연변이체에서 *LOVI* 유전자의 전사체 농도가 매우 높은 수준으로 발현됨을 확인할 수 있었다(도 4).

<74> <실시예 5>

<75> 애기장대에서 *LOVI* 유전자의 발현 패턴 조사

<76> 생식시기의 애기장대 야생형에서 다양한 조직들로부터 RNA를 추출하고

*LOV1*에 특이적인 탐침으로 노던 블롯 분석을 수행하여 *LOV1* 유전자 전사체의 공간적 분포 양상을 조사하였다. 애기장대 야생형에서 꽃눈(floral buds), 꽃(flowers), 장각 (siliques), 경엽(cauline leaves), 로젯잎(rosette leaves) 및 뿌리(roots) 조직으로부터 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 이용하여 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 노던 블롯 분석을 수행하였다.

- <77> 또한, *LOV1* 프로모터와 *GUS*(beta-glucuronidase) 유전자가 융합된 형태의 구조물로 애기장대를 형질전환 한 다음 *GUS* 유전자 활성을 분석하여 *LOV1* 유전자의 발현 양상을 확인하였다. *LOV1* 프로모터와 *GUS* 유전자가 융합된 형태의 구조물은 다음과 같이 제조하였다. 애기장대의 게놈 DNA를 주형으로 하여 정방향 프라이머(서열번호 4)와 역방향 프라이머(서열번호 5)로 PCR 증폭함으로써 *LOV1* 유전자의 프로모터 지역을 증폭하였다. PCR 증폭 조건은 GeneAMP PCR 시스템 9700을 사용하여 94℃에서 1분, 60℃에서 1분, 72℃에서 2분간씩 35회 반복하였다.

<78> *LOV1* 정방향 프라이머(서열번호 4)

<79> 5'-AATAGATCTGGTACGCGACATCCATATTGAAA-3'

<80> *LOV1* 역방향 프라이머(서열번호 5)

<81> 5'-AATAGATCTCATGGGAATGATGCTTGTTGTG-3'

- <82> 증폭된 *LOV1* 유전자 프로모터를 pGEM[®]-T Easy 벡터(Promega)에 클로닝하였다. 이를 *Bgl*/II로 절단하고 그 절편을 *GUS*-nos 유전자를 포함하는 pBluescript 벡터에 연결하였다. *LOV1* 프로모터::*GUS*-nos 절편을 pBluescript 벡터에서 바이너리 벡터인 pCAMBIA3200으로

서브클로닝하였다(도 5). 상기 바이너리 벡터로 실시예 1과 동일한 방법에 따라 형질전환한 아그로박테리움을 이용하여 *LOV1* 프로모터::*GUS* 재조합 플라스미드를 애기장대 야생형에 도입하였다. 형질전환체의 각 조직에서 *GUS* 활성을 5-브로모-4-클로로-3-인돌리글루쿠로나이드(5-bromo-4-chloro-3-indoly glucuronide, X-Gluc)를 사용한 *GUS* 조직화학적 분석을 통해 측정하였다. 또한, 형질전환체를 40일간 재배하면서, 시간에 따른 *LOV1* 유전자의 발현 패턴도 함께 조사하였다. *GUS* 조직화학적 분석은 공지된 방법을 일부 변형하여 수행하였다 (Jefferson R. A. et al., *EMBO J.*, 6:3901-3907, 1987). 형질전환체로부터 수득한 각 조직 시료를 *GUS* 반응 용액(1mM X-Gluc, 50mM 인산 나트륨, pH 7.0, 0.1% 트립톤 X-100)에 12시간 동안 담가 둔 후 에탄올로 세척하였다. 남색을 띠는 시료를 마이크로톰(Lecia)으로 절단하고 Nikon SMZ 10A 해부현미경(Nikon Co., Tokyo)을 사용하여 관찰하였다.

<83> 또한, 상기 형질전환체로부터 수득한 잎과 줄기의 정단 조직을 미세 절단하고 이의 단면을 현미경으로 관찰하였다. 상기 잎과 줄기의 정단 조직을 즉시 FAA-고정 용액(50% 에탄올, 5% 아세트산 및 3.7% 포름알데히드)에 침지시킨 다음 진공 상태에서 15분간 방치하였다. 고정된 조직을 FAA-고정 용액에 침지시킨 채로 16시간 동안 상온에 방치해 놓은 다음 고정된 조직을 에탄올로 수분을 제거하고 자일렌(xylene)으로 채워주었다. 탈수된 조직은 적어도 3일 동안 파라플라스트(paraplast)로 채워 준 후 상기 조직을 마이크로톰(Leica)을 이용하여 8 μ m 단면으로 절단하였다. 얇게 절단된 단면을 슬라이드 글라스(sigma)위에 부착시키고 슬라이드 워머(slide warmer, Fisher)에서 45 $^{\circ}$ C로 하룻밤 동안 놓아두었다. 조직이 견고히 부착된 슬라이드 글라스를 자일렌에서 30분 동안 담가 두어 파라핀을 제거한 다음 해부현미경으로 관찰하였다.

- <84> 애기장대 야생형의 각 조직으로부터 추출한 RNA를 사용하여 노던 블롯 분석을 수행한 결과, *LOV1* 유전자는 모든 조직에서 기본적으로 발현하고 있는 것으로 나타났으며 특히, 주로 줄기에서 발현하고 있음이 관찰되었다(도 6).
- <85> *LOV1* 프로모터와 *GUS* 융합 구조물로 형질전환된 애기장대에서 *GUS* 활성은 주로 정단 조직에서 나타났다. *LOV1* 유전자는 정단 분열 조직에서 강하게 발현되었으며, 어린 잎 원기에서도 발현되는 것으로 나타났다. 그러나, 완전히 펼쳐진 잎에서는 *GUS* 활성이 나타나지 않았다. 형질전환체로부터 수득한 줄기의 정단 조직과 잎을 세로로 미세 절단한 경우에, 정단 분열 조직에서 *GUS* 활성이 나타났다. 가로로 절단한 경우에는 잎 원기와 정단 분열 조직에서 *GUS* 활성이 나타났다(7a). 또한, *GUS* 활성은 화서분열조직(inflorescence meristem)과 측생분열조직(axillary meristem)에서도 나타났다(도 7b). 이러한 결과로부터 *LOV1* 유전자는 빠르게 증식하는 조직과 미성숙한 조직에서 높은 수준으로 발현함을 알 수 있었다. 또한, *LOV1* 유전자의 발현은 배 발달 동안에도 나타나며(도 7b), 개화가 일어난 후 즉, 약 20-21일째 후에도 지속되는 것으로 관찰되었다(도 7c).
- <86> 이와 같은 *LOV1* 유전자의 발현 패턴은 *AGL20* 유전자의 발현 패턴과 유사한 것이다. 이로부터 *LOV1* 유전자가 다른 종류의 개화시기 조절 유전자와 유전적 상호 관련성이 있을 것으로 추정할 수 있었다.
- <87> <실시예 6>
- <88> 애기장대 야생형과 *lov1-1D* 돌연변이체에서 줄기 정단 분열 조직 및 잎의 해부학적 단면 비교

<89> 애기장대 야생형과 *lov1-ID* 돌연변이체의 줄기 정단 분열 조직과 잎의 해부학적 구조 차이를 조사하기 위해 9일째 되는 줄기 정단 분열 조직과 잎을 상기 실시예 5와 동일한 방법으로 절단하여 그 단면을 Nikon SMZ 10A 해부현미경(Nikon Co., Tokyo)으로 관찰하였다.

<90> 실험 결과, *lov1-ID* 돌연변이체의 줄기 정단 분열 조직의 세로 단면이 야생형에 비해 좀더 넓고 큰 것으로 보였다. 이는 *lov1-ID* 돌연변이체의 줄기 정단 분열 조직의 세포 크기가 야생형에 비해 증가했기 때문이라 사료되었다(도 8). 또한, 같은 발달 시기의 야생형과 돌연변이체의 잎 단면은 뚜렷한 차이를 보이지 않았으나, 나중에 생성된 돌연변이체의 잎 단면을 관찰해본 결과 야생형에 비해 세포의 크기와 수가 증가되었음이 관찰되었다(도 9). 이는 돌연변이체에서 *LOV1* 유전자의 과다발현 되었기 때문이라 사료되었다. 이러한 *LOV1* 유전자의 발현 패턴으로 볼 때, 식물체가 개화로 전환하는 동안 *LOV1* 유전자가 줄기 정단 분열 조직과 잎에서 중요한 기능을 수행하는 것으로 추정할 수 있었다. 특히, *LOV1* 유전자의 과다발현으로 인해 돌연변이체에서 잎의 수가 증가하는 결과로부터 상기 돌연변이체는 야생형에 비해 영양생장 시기가 길어지면서 개화가 지연되었음을 재확인할 수 있었다.

<91> <실시예 7>

<92> *LOV1* 유전자와 *AGL20* 및 *FLC*와의 상호작용 조사

<93> 본 발명에서 분리된 *LOV1* 유전자가 다른 종류의 식물의 개화시기 조절 유전자인 *AGL20* 및 *FLC*와 상호 작용하는지를 조사하였다. 상기 *AGL20* 유전자는 개화를 촉진하는 유전자로 알려져 있으며, *FLC* 유전자에 의해 억제된다고 알려져 있다. *FLC* 유전자는 MADS-박스 개화시기 촉진 유

전자인 *AGL20*의 프로모터에 결합하여 *AGL20*을 억제하는 개화 전환의 강력한 억제인자로 알려져 있다(Hepworth S. R. et al., *EMBO J.* 21(6):4327-4337, 2002; Michael S. D. et al., , 11:949-956, 1999). 본 발명자들은 *lov1-ID* 돌연변이체에서 *AGL20* 유전자와 *FLC* 유전자의 발현 수준을 각각의 유전자에 대한 특이적인 탐침을 이용하여 노던 블롯 분석으로 조사하였다. 공지된 *FLC* 유전자(Michaels and Amasino, *Plant Cell*, 11: 949-956, 1999)와 *AGL20* 유전자(Lee et al., *Genes and Development* 14: 2366-2376, 2000)의 서열로부터 각각의 특이적인 탐침을 하기와 같이 제조하였다.

<94> *FLC* 정방향 프라이머(서열번호 6)

<95> 5'-CCCGTTAACTGAACCCAAACCTGAGGA-3'

<96> *FLC* 역방향 프라이머(서열번호 7)

<97> 5'-CCACTAGTCGCCCTTATCAGCGGA-3'

<98> *AGL20* 정방향 프라이머(서열번호 8)

<99> 5'-CCCGTTAACATGGTGAGGGGCAAACT-3'

<100> *AGL20* 역방향 프라이머(서열번호 9)

<101> 5'-CCCGTTAACTCACTTTCTTGAAGAACAAGG-3'

- <102> 노던 블롯 분석 방법은 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 수행하였다. 한편, 애기장대 야생형에서 개화가 시작될 때 *lov1-ID* 돌연변이체는 여전히 영양생장 상태이기 때문에, 야생형에서 꽃대가 나오기 전인 재배 18 일째의 야생형과 돌연변이체로부터 RNA를 분리하여 사용하였다.
- <103> 실험 결과, *lov1-ID* 돌연변이체의 경우 야생형에 비해 *AGL20*의 발현이 감소하였으나 *FLC*의 발현 정도는 돌연변이체와 야생형에서 비슷하게 나타났다. 이러한 결과로부터 *LOV1* 유전자의 과다 발현이 *AGL20*의 발현을 감소시켜 식물체의 개화를 지연시킨다는 것을 알 수 있었다(도 10).
- <104> 결론적으로, 본 발명에서 분리한 *LOV1* 유전자는 식물체가 영양생장에서 생식생장으로 전환하는 동안에 줄기 정단 분열 조직에서 중요한 기능을 하며, 개화를 결정하는 복잡한 유전학적인 네트워크상에서 개화촉진 유전자인 *AGL20*을 하향조절(downregulation)함을 확인할 수 있었다(도 11).

【발명의 효과】

- <105> 본 발명에서 분리된 *LOV1* 유전자 및 상기 유전자로부터 발현되는 *LOV1* 단백질은 식물의 개화 관련 형질의 개선 및 타 식물체에서 개화 시기 조절 유전자의 탐색 등에 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명에 따라 식물체의 개화시기를 촉진함으로써 꽃과 종자를 단시간 내에 생산하거나 또는 식물체의 개화시기를 지연시켜 영양생장을 지속적으로 유도함으로써 식물체로부터 잎이나 줄기와 같은 유용한 부분의 생산량을 증대시킬 수 있는 효과가 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

서열번호 2로 표시되는 식물의 개화시기 조절 단백질 LOV1.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 애기장대로부터 분리된 것을 특징으로 하는 식물의 개화시기 조절 단백질 LOV1.

【청구항 3】

제1항의 LOV1 단백질을 암호화하는 식물의 개화시기 조절 유전자.

【청구항 4】

제3항에 있어서, 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 식물의 개화시기 조절 유전자.

【청구항 5】

제3항에 있어서, 서열번호 3으로 표시되는 식물의 개화시기 조절 유전자 LOV1.

【청구항 6】

제3항에 있어서, 개화촉진 유전자인 *AGL20* 유전자를 억제함을 특징으로 하는 식물의 개화시기 조절 유전자.

【청구항 7】

제3항의 식물의 개화시기 조절 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

【청구항 8】

제7항의 벡터로 형질전환된 박테리아.

【청구항 9】

제3항의 유전자를 이용하여 식물체의 개화시기를 조절하는 방법.

【청구항 10】

제9항에 있어서, 식물체에서 *LOV1* 유전자를 과다 발현시킴으로써 개화시기를 지연시키는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 11】

제9항에 있어서, 식물체에서 *LOV1* 유전자의 발현을 억제시킴으로써 개화시기를 촉진시키는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 12】

제9항에 있어서, 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 팥, 귀리, 수수를 포함하는 식량 작물류, 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근을 포함하는 채소 작물류, 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩, 유채를 포함하는 특용 작물류, 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나를 포함하는 과수류, 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립을 포함하는 화훼류 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐, 페레니얼라이그라스 등을 포함하는 사료 작물류로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 13】

제1항의 단백질 또는 제3항의 유전자를 이용하여 식물의 개화시기 조절 유전자 또는 단백질을 선별하는 방법.

【청구항 14】

제1항의 단백질 또는 제1항의 단백질을 발현하는 재조합 세포와 후보물질을 배양한 다음 LOV1 단백질의 활성 또는 발현에 미치는 효과를 측정하는 단계를 포함함을 특징으로 하는 제1항의 단백질의 활성 또는 발현에 영향을 주는 화합물을 동정하는 방법.

【청구항 15】

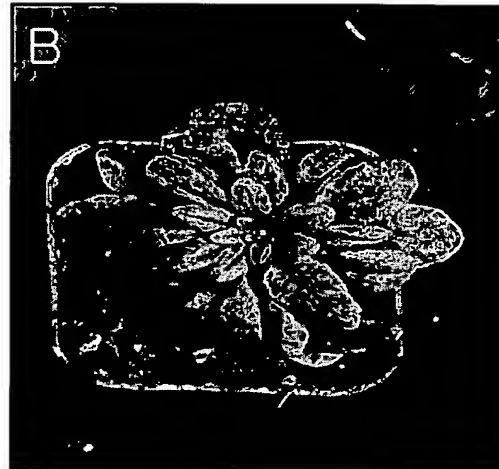
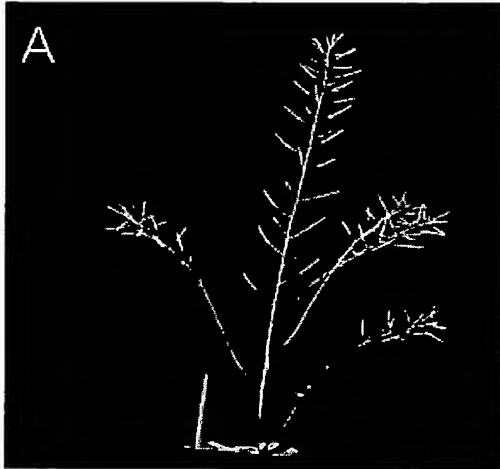
제14항에 있어서, 상기 화합물이 LOV1 단백질 활성 또는 발현을 촉진함을 특징으로 하는 방법

【청구항 16】

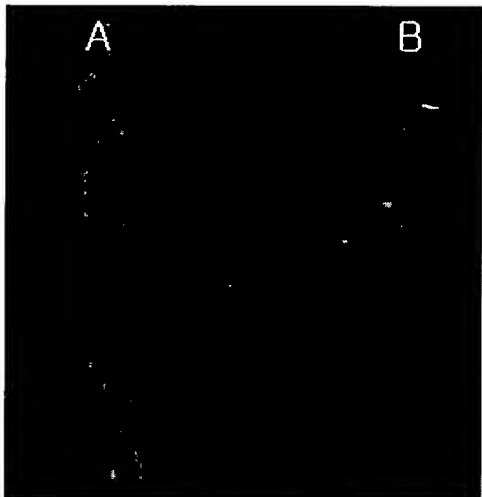
제14항에 있어서, 상기 화합물이 LOV1 단백질 활성 또는 발현을 억제함을 특징으로 하는 방법

【도면】

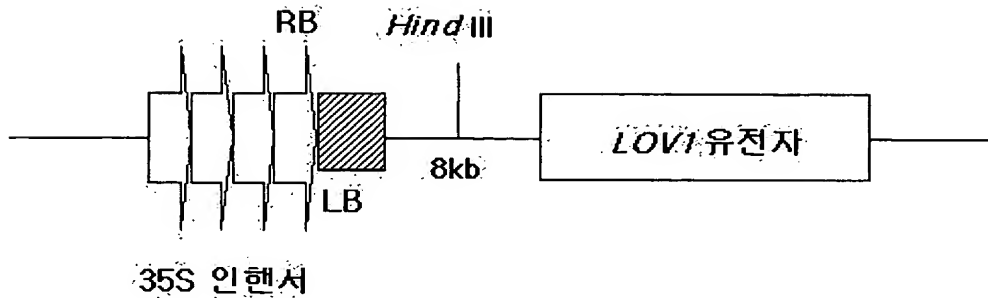
【도 1a】



【도 1b】



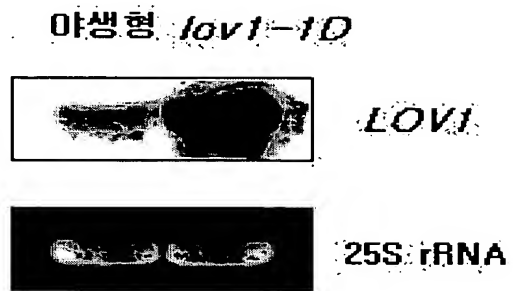
【도 2】



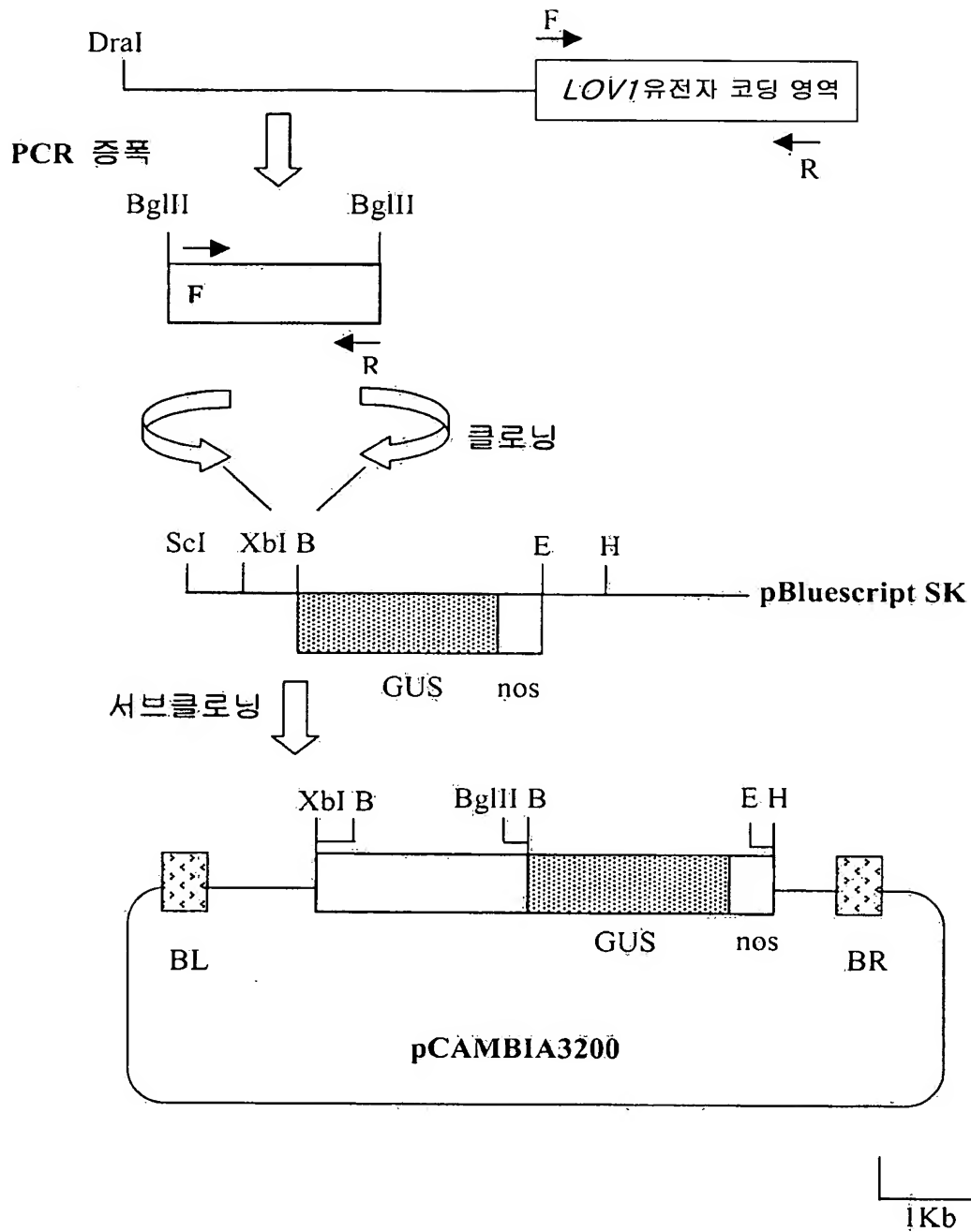
【도 3】

LOV1	(1)	maivszttajipmznqvnnekgiedndhrgrgQBESHVQN-BDEADDDHDMVMPPGRFHP
NAM	(1)	-----ME-----N-YQHFDGSDSN-LPPGRFHP
CUC1	(1)	-----MDVDVFNqWGRPRFEDESLMPPGRFHP
CUC2	(1)	-----MDIPVYH-YDHGG--DSQYLPPGRFHP
LOV1	(60)	TBELLIEFYLRKKEGKRPNVELITFLDLRYDPWELPAMAAIGKKENWYFVPRDRKYRN
NAM	(23)	TDEBLITYYLLKKVLDENFTGRAIABVDLNKCEPWELPEKAKMGEKENWYFFSLDRKYP
CUC1	(29)	TDEBLITYYLLKKVLDENFSCAAISQVDLNKSEPWELPEKAKMGEKENWYFFTLDRKYP
CUC2	(26)	TDEBLITHYLLRKVLDGCFSSRAIABVDLNKCEPWQLPGRAKMGEKENWYFFSLDRKYP
LOV1	(120)	GDRPNRVTTSGYWKATGADRMIRSETSRPIGLKKTLVFYSGKAPKGTRTSWIMNEYRL-
NAM	(83)	GLRTNRATEAGYWKATGKDREIYSSKTSALVGMKKTLVFYRGRAPKGEKSNWVMHEYRLD
CUC1	(89)	GLRTNRATEAGYWKATGKDREIKSSKTKSLGKKTLVFYKGRAPKGEKSCWVMHEYRLD
CUC2	(86)	GLRTNRATEAGYWKATGKDREIFSSKTCALVGMKKTLVFYKGRAPKGEKSNWVMHEYRLB
LOV1	(178)	---PHHETEKYQK
NAM	(143)	GKPAYHYISRSSK
CUC1	(149)	GKPSYHYISSAK
CUC2	(146)	GKPSYHYISRSSK

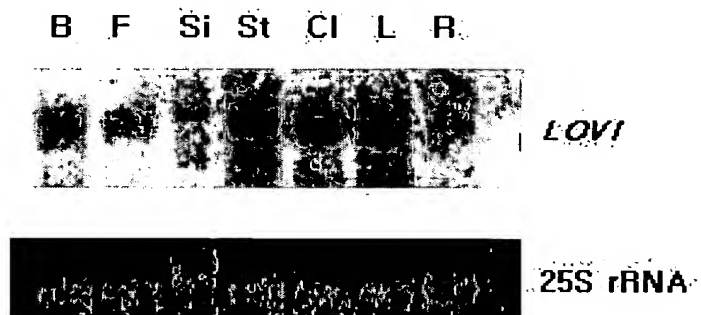
【도 4】



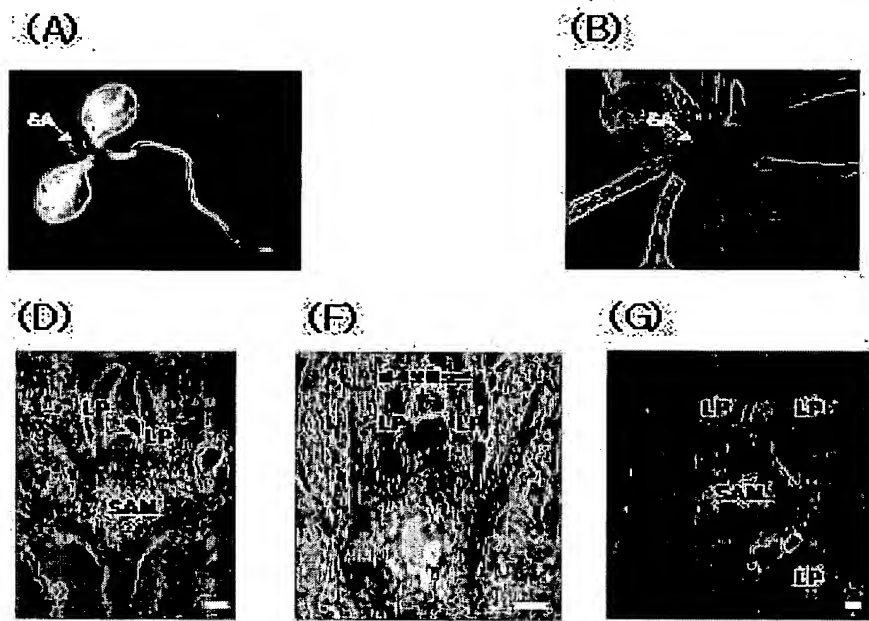
【도 5】



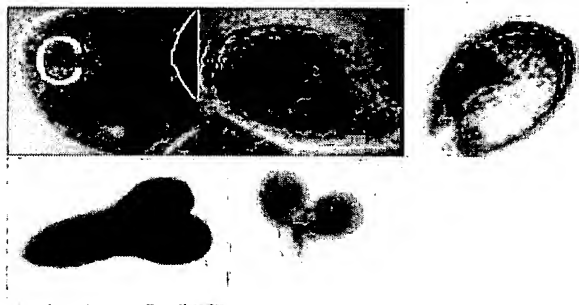
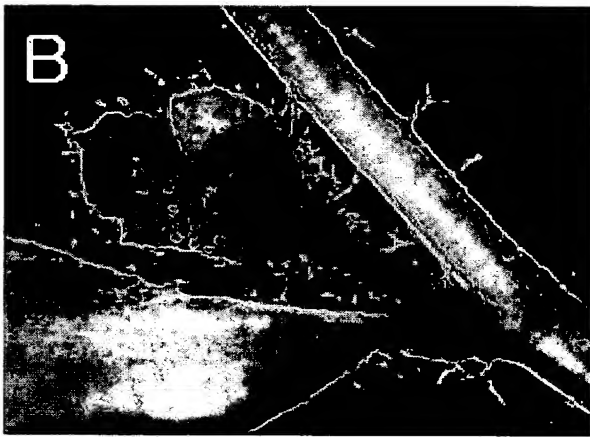
【도 6】



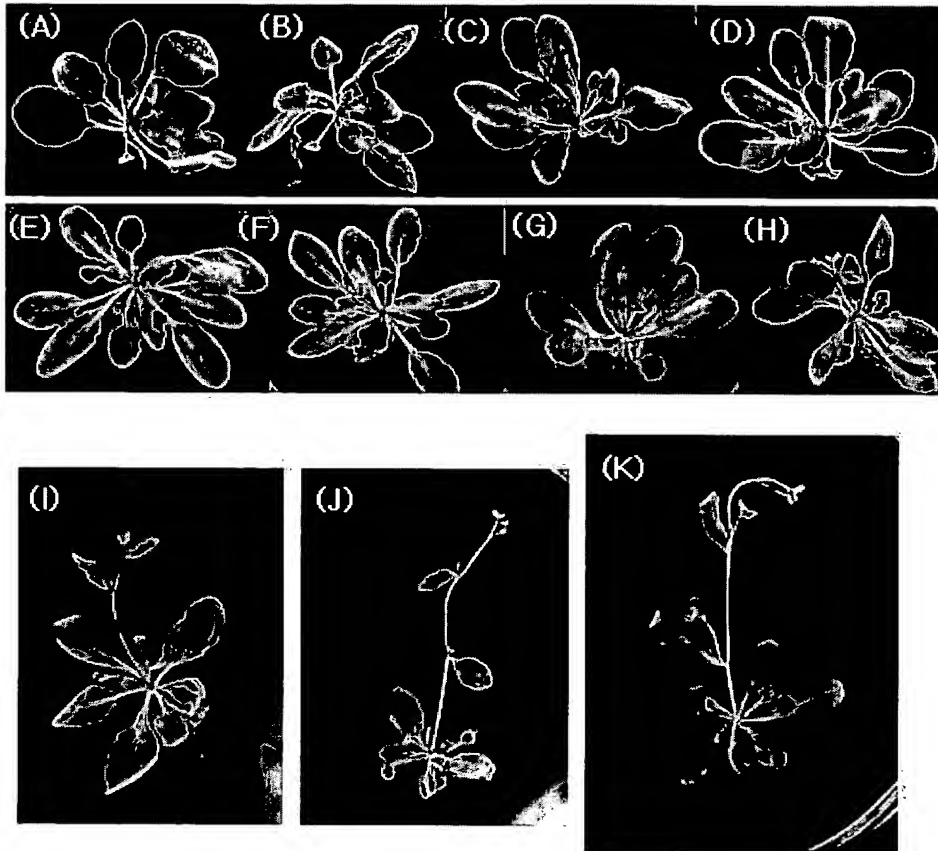
【도 7a】



【도 7b】



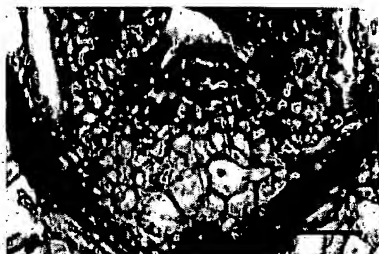
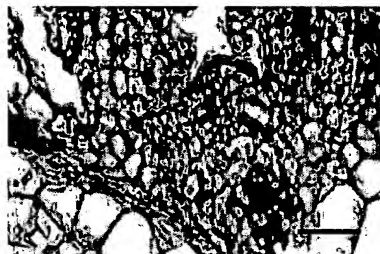
【도 7c】



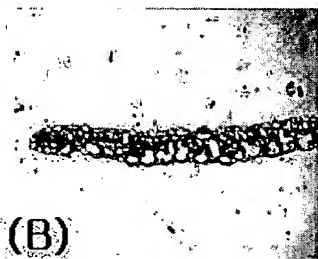
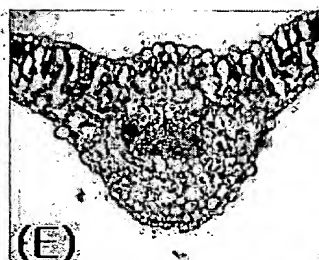
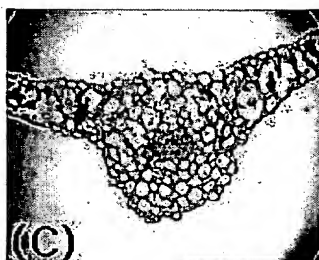
【도 8】

(A)

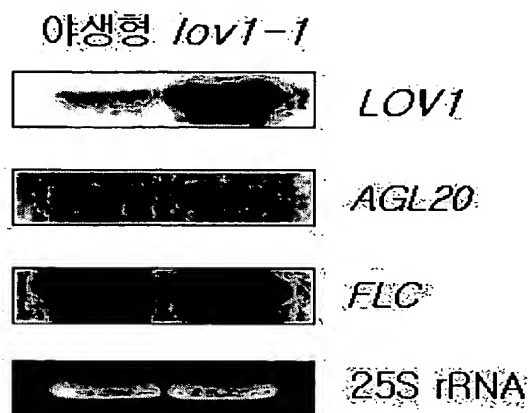
(B)



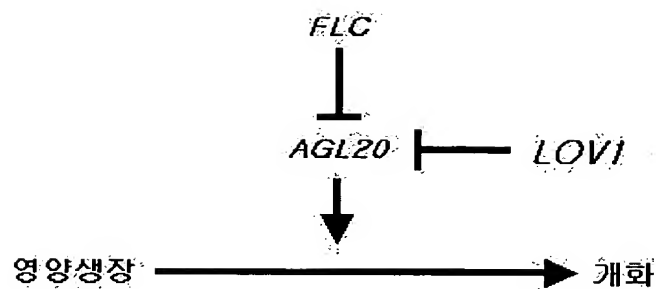
【도 9】



【도 10】



【도 11】



【서열목록】

<110> Seoul National University in Korea <120> Gene controlling flowering time of plants and method for manipulating flowering time of plant using the same

<160> 9 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 1140 <212> DNA <213>

Arabidopsis thaliana <220> <221> CDS <222> (1)..(1137) <223> cDNA of LOV1

gene <400> 1 atg gca att gta tcc tcc aca aca agc atc att ccc atg agt aac caa

48 Met Ala Ile Val Ser Ser Thr Thr Ser Ile Ile Pro Met Ser Asn Gln 1

5 10 15 gtc aac aat aac gaa aaa ggt ata gaa

gac aat gat cat aga ggc ggc 96 Val Asn Asn Asn Glu Lys Gly Ile Glu Asp Asn

Asp His Arg Gly Gly 20 25 30
 caa gag agt cat gtc caa aat gaa gat gaa gct gat gat cat gat cat 144 Gln Glu
 Ser His Val Gln Asn Glu Asp Glu Ala Asp Asp His Asp His 35
 40 45 gac atg gtc atg ccc gga ttt aga ttc cat cct acc
 gaa gaa gaa ctc 192 Asp Met Val Met Pro Gly Phe Arg Phe His Pro Thr Glu Glu
 Glu Leu 50 55 60 ata gag
 ttt tac ctt cgc cga aaa gtt gaa ggc aaa cgc ttt aat gta 240 Ile Glu Phe Tyr
 Leu Arg Arg Lys Val Glu Gly Lys Arg Phe Asn Val 65 70
 75 80 gaa ctc atc act ttc ctc gat ctt tat cgc tat gat cct tgg gaa
 ctt 288 Glu Leu Ile Thr Phe Leu Asp Leu Tyr Arg Tyr Asp Pro Trp Glu Leu
 85 90 95 cct gct atg gcg gcg ata gga gag aaa
 gag tgg tac ttc tat gtg cca 336 Pro Ala Met Ala Ala Ile Gly Glu Lys Glu Trp
 Tyr Phe Tyr Val Pro 100 105 110
 aga gat cgg aaa tat aga aat gga gat aga ccg aac cga gta acg act 384 Arg Asp
 Arg Lys Tyr Arg Asn Gly Asp Arg Pro Asn Arg Val Thr Thr 115
 120 125 tca gga tat tgg aaa gcc acc gga gct gat agg atg
 atc aga tcg gag 432 Ser Gly Tyr Trp Lys Ala Thr Gly Ala Asp Arg Met Ile Arg
 Ser Glu 130 135 140 act tct
 cgg cct atc gga tta aag aaa acc cta gtt ttc tac tct ggt 480 Thr Ser Arg Pro
 Ile Gly Leu Lys Lys Thr Leu Val Phe Tyr Ser Gly 145 150
 155 160 aaa gcc cct aaa ggc act cgt act agt tgg atc atg aac gag tat

cgt 528 Lys Ala Pro Lys Gly Thr Arg Thr Ser Trp Ile Met Asn Glu Tyr Arg
 165 170 175 ctt ccg cac cat gaa acc gag aag tac
 caa aag gct gaa ata tca ttg 576 Leu Pro His His Glu Thr Glu Lys Tyr Gln Lys
 Ala Glu Ile Ser Leu 180 185 190
 tgc cga gtg tac aaa agg cca gga gta gaa gat cat cca tcg gta cca 624 Cys Arg
 Val Tyr Lys Arg Pro Gly Val Glu Asp His Pro Ser Val Pro 195
 200 205 cgt tct ctc tcc aca aga cat cat aac cat aac tca
 tcg aca tca tcc 672 Arg Ser Leu Ser Thr Arg His His Asn His Asn Ser Ser Thr
 Ser Ser 210 215 220 cgt tta
 gcc tta aga caa caa caa cac cat tca tcc tcc tct aat cat 720 Arg Leu Ala Leu
 Arg Gln Gln Gln His His Ser Ser Ser Ser Asn His 225 230
 235 240 tcc gac aac aac ctt aac aac aac aac aac atc aac aat ctc gag
 aag 768 Ser Asp Asn Asn Leu Asn Asn Asn Asn Asn Ile Asn Asn Leu Glu Lys
 245 250 255 ctc tcc acc gaa tat tcc ggc gac ggc
 agc aca aca aca acg acc aca 816 Leu Ser Thr Glu Tyr Ser Gly Asp Gly Ser Thr
 Thr Thr Thr Thr Thr 260 265 270
 aac agt aac tct gac gtt acc att gct cta gcc aat caa aac ata tat 864 Asn Ser
 Asn Ser Asp Val Thr Ile Ala Leu Ala Asn Gln Asn Ile Tyr 275
 280 285 cgt cca atg cct tac gac aca agc aac aac aca ttg
 ata gtc tct acg 912 Arg Pro Met Pro Tyr Asp Thr Ser Asn Asn Thr Leu Ile Val
 Ser Thr 290 295 300 aga aat

cat caa gac gat gat gaa act gcc att gtt gac gat ctt caa 960 Arg Asn His Gln
 Asp Asp Asp Glu Thr Ala Ile Val Asp Asp Leu Gln 305 310
 315 320 aga cta gtt aac tac caa ata tca gat gga gcg aca acg cta atg
 cct 1008 Arg Leu Val Asn Tyr Gln Ile Ser Asp Gly Ala Thr Thr Leu Met Pro
 325 330 335 caa act caa gcg gcg tta gct atg aac
 atg att cct gca gga acg att 1056 Gln Thr Gln Ala Ala Leu Ala Met Asn Met Ile
 Pro Ala Gly Thr Ile 340 345 350
 cca aac aat gct ttg tgg gat atg tgg aat cca ata gta cca gat gga 1104 Pro Asn
 Asn Ala Leu Trp Asp Met Trp Asn Pro Ile Val Pro Asp Gly 355
 360 365 aac aga gat cac tat act aat att cct ttt aag
 taa 1140 Asn Arg Asp His Tyr Thr Asn Ile Pro Phe Lys
 370 375 <210> 2 <211> 379 <
 212> PRT <213> Arabidopsis thaliana <400> 2 Met Ala Ile Val Ser Ser Thr Thr Ser
 Ile Ile Pro Met Ser Asn Gln 1 5 10
 15 Val Asn Asn Asn Glu Lys Gly Ile Glu Asp Asn Asp His Arg Gly Gly 20
 25 30 Gln Glu Ser His Val Gln Asn Glu Asp Glu Ala Asp Asp His Asp
 His 35 40 45 Asp Met Val Met Pro Gly Phe
 Arg Phe His Pro Thr Glu Glu Glu Leu 50 55 60
 Ile Glu Phe Tyr Leu Arg Arg Lys Val Glu Gly Lys Arg Phe Asn Val 65
 70 75 80 Glu Leu Ile Thr Phe Leu Asp Leu Tyr Arg
 Tyr Asp Pro Trp Glu Leu 85 90 95

Pro Ala Met Ala Ala Ile Gly Glu Lys Glu Trp Tyr Phe Tyr Val Pro 100
 105 110 Arg Asp Arg Lys Tyr Arg Asn Gly Asp Arg Pro Asn Arg Val Thr
 Thr 115 120 125 Ser Gly Tyr Trp Lys Ala Thr
 Gly Ala Asp Arg Met Ile Arg Ser Glu 130 135 140
 Thr Ser Arg Pro Ile Gly Leu Lys Lys Thr Leu Val Phe Tyr Ser Gly 145
 150 155 160 Lys Ala Pro Lys Gly Thr Arg Thr Ser Trp
 Ile Met Asn Glu Tyr Arg 165 170 175
 Leu Pro His His Glu Thr Glu Lys Tyr Gln Lys Ala Glu Ile Ser Leu 180
 185 190 Cys Arg Val Tyr Lys Arg Pro Gly Val Glu Asp His Pro Ser Val
 Pro 195 200 205 Arg Ser Leu Ser Thr Arg His
 His Asn His Asn Ser Ser Thr Ser Ser 210 215 220
 Arg Leu Ala Leu Arg Gln Gln Gln His His Ser Ser Ser Ser Asn His 225
 230 235 240 Ser Asp Asn Asn Leu Asn Asn Asn Asn Asn
 Ile Asn Asn Leu Glu Lys 245 250 255
 Leu Ser Thr Glu Tyr Ser Gly Asp Gly Ser Thr Thr Thr Thr Thr 260
 265 270 Asn Ser Asn Ser Asp Val Thr Ile Ala Leu Ala Asn Gln Asn Ile
 Tyr 275 280 285 Arg Pro Met Pro Tyr Asp Thr
 Ser Asn Asn Thr Leu Ile Val Ser Thr 290 295 300
 Arg Asn His Gln Asp Asp Asp Glu Thr Ala Ile Val Asp Asp Leu Gln 305
 310 315 320 Arg Leu Val Asn Tyr Gln Ile Ser Asp Gly
 Ala Thr Thr Leu Met Pro 325 330 335

Gln Thr Gln Ala Ala Leu Ala Met Asn Met Ile Pro Ala Gly Thr Ile 340

345 350 Pro Asn Asn Ala Leu Trp Asp Met Trp Asn Pro Ile Val Pro Asp

Gly 355 360 365 Asn Arg Asp His Tyr Thr Asn

Ile Pro Phe Lys 370 375 <210> 3 <211> 2606

<212> DNA <213> Arabidopsis thaliana <220> <221> gene <222> (1)..(2606)

<223> genomic DNA of LOV1 gene <400> 3 atggcaattg tatcctccac aacaagcatc

attcccatga gtaaccaagt caacaataac 60 gaaaaaggta tagaagacaa tgatcataga

ggcggccaag agagtcattgt ccaaaatgaa 120 gatgaagctg atgatcatga tcatgacatg

gtcatgccccg gatttagatt ccatactacc 180 gaagaagaac tcatagagtt ttaccttcgc

cgaaaagtgt aaggcaaacg ctttaattgta 240 gaactcatca ctttcctcga tctttatcgc

tatgatcctt gggaacttcc tggtaaatat 300 acattcacat aaacacacat aaatcatctc

aaactatttg gaaatcttaa tttctattca 360 tatgttaaga tctttcttct ctcttatcac

tttctctctc tatttctttt tttttaacct 420 atatatgtac ctacctcctt atgaagtatt

actatgtcga tcgttaacaa ttctcaatat 480 ctttaaacgc ttctccctct ttagtttctt

tcttaaatta acctaattaa acaacctaca 540 tatatatcat aagatatata aatatgtgta

tgttttcata attagcttat gtatgtttaa 600 tcatagatat atgtatatgc agctatggcg

gcgataggag agaaagagtg gtacttctat 660 gtgccaagag atcggaata tagaaatgga

gatagaccga accgagtaac gacttcagga 720 tattggaaag ccaccggagc tgataggatg

atcagatcgg agacttctcg gcctatcgga 780 ttaaagaaaa ccctagtittt ctactctggt

aaagccccta aaggcactcg tactagttagg 840 atcatgaacg agtatcgtct tccgcacat

gaaaccgaga agtaccaaaa ggtataaatt 900 ctactataac tctatatata tcctattcat

acatacatag atataaccct agctaggtgg	960 tgaggccttt aaaattgaaa ttaatcccta
gacagtttga attttttctt ttttgactag	1020 ttttatttat ttattttgga attgattcga
taagatcaaa aatacttgtg aatggactaa	1080 atgtcaggcg gcgtttgcgc ttaaaccag
aaaaatgttc atgtcatatg cgtgaactct	1140 ttaaattgct agacatggcc catatgttat
agtagaatac attaatagat agatgcatac	1200 acatatatat aaacacacaa gtatcacact
cgacattcat ataccttaat tctgcagaga	1260 catagttagt ttttcttaca atttatgaca
tgaatgttcc tgctcttctt cacattaatt	1320 catgtcttct atttaagtta cccaacattt
tttgaaataa tttggcatat atgaattata	1380 ccaacatatt tatatgcgaa catttaaaat
ctatacgaat gataacggtt tatggagtag	1440 accgaaaaaa tattatgtat acggaaaatg
acaatggata gataaataca ttttttgggc	1500 tctttcgact tatatgtcgt caccatttga
aaccataaat ttataaaatt ttctatgtat	1560 atatatgata ttatgatgta tgcataagac
agctaaaaca acagggttga cataattatc	1620 tatgtgtatg tattgcacat tcacttgtac
taataaaaact aaaattacgc aattaaatat	1680 ataaaaata ataaatataa tcactttaat
tatatttgca ttgttacgtc atatgatagt	1740 actctaaatt tcttctaaac gtgctatctt
tttttgctaa tgctaacttt acatagtttg	1800 tgaatcttct ttcaaaacca tatcttcgat
aatgatatt ttcatagat attgttagtc	1860 tatatttgat aatttgatat atgtatcaag
tctctaataca atgtgctcat gtataattat	1920 aggctgaaat atcattgtgc cgagtgtaca
aaaggccagg agtagaagat catccatcgg	1980 taccacgttc tctctccaca agacatcata
accataactc atcgacatca tcccgtttag	2040 ccttaagaca acaacaacac cattcatcct
cctctaataca ttccgacaac aaccttaaca	2100 acaacaacaa catcaacaat ctcgagaagc
tctccaccga atattccggc gacggcagca	2160 caacaacaac gaccacaaac agtaactctg

```

acgttacat tgctctagcc aatcaaaaaca      2220 tatatcgctcc aatgccttac gacacaagca
acaacacatt gatagtctct acgagaaatc      2280 atcaagacga tgatgaaact gccattgttg
acgatcttca aagactagtt aactacaaaa      2340 tatcagatgg aggtaacatc aatcaccaat
actttcaaat tgctcaacag ttcatcata      2400 ctcaacaaca aaatgctaac gcaaacgcat
tacaattggg ggctgcggcg actacagcga      2460 caacgctaat gcctcaaact caagcggcgt
tagctatgaa catgattcct gcaggaacga      2520 ttccaaacaa tgctttgtgg gatatgtgga
atccaatagt accagatgga aacagagatc      2580 actatactaa tattcctttt aagtaa

2606 <210>    4 <211>    32 <212>    DNA <213>    Artificial Sequence <220> <223>
Sense primer of LOV1 <400>    4 aatagatctg gtacgcgaca tccatattga aa

32 <210>    5 <211>    31 <212>    DNA <213>    Artificial Sequence <220> <223>
Antisense primer of LOV1 <400>    5 aatagatctc atgggaatga tgcttgttgt g

31 <210>    6 <211>    27 <212>    DNA <213>    Artificial Sequence <220> <223>
Sense primer of FLC <400>    6 cccgttaact gaacccaaac ctgagga

27 <210>    7 <211>    24 <212>    DNA <213>    Artificial Sequence <220> <223>
Antisense primer of FLC <400>    7 ccactagtcg cccttatcag cgga

24 <210>    8 <211>    27 <212>    DNA <213>    Artificial Sequence <220> <223>
Sense primer of AGL20 <400>    8 cccgttaaca tggtaggggg caaaact

27 <210>    9 <211>    30 <212>    DNA <213>    Artificial Sequence <220> <223>
Antisense primer of AGL20 <400>    9 cccgttaact cactttcttg aagaacaagg

```